

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

LEANDRO FERNANDES

**EFEITOS DO TREINAMENTO E DA INTERRUPÇÃO DO  
TREINAMENTO EM CAMUNDONGOS PRENHES E SEUS  
EFEITOS NA PROLE**

Santos

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

LEANDRO FERNANDES

**EFEITOS DO TREINAMENTO E DA INTERRUPÇÃO DO  
TREINAMENTO EM CAMUNDONGOS PRENHES E SEUS  
EFEITOS NA PROLE**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de São Paulo como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
bacharel em Educação Física – modalidade  
saúde.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia D’Almeida

Santos

2009

## **LEANDRO FERNANDES**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de São Paulo como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
bacharel em Educação Física – modalidade  
saúde.**

**Data de aprovação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_**

### **BANCA EXAMINADORA:**

**Vânia D' Almeida**

Universidade Federal de São Paulo

---

**José Rodrigo Pauli**

Universidade Federal de São Paulo

---

**Alessandra Medeiros**

Universidade Federal de São Paulo

---

## ***Dedicatória***

---

À **minha família**, pelo carinho e apoio, mesmo os mais distantes.

A todos os **professores do curso de Educação Física modalidade saúde**, pelas importantes contribuições para minha formação acadêmica.

A **Bruno Frederico Aguiar Calegare**, pessoa com o qual eu trabalhei desde o começo, responsável por muitos ensinamentos e também momentos divertidos.

Aos companheiros de laboratório, em vários momentos, **Allan, Daniel, Francine (francisne, frantasma), Karen, Kênia, Lisandro, Marina, Mayra, Sérgio, Suellen, Vanessa C. e Vanessa (Nessa)**.

Aos **CAMUNDONGOS** que participaram deste estudo, pois sem eles este trabalho não seria possível.

À **Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro.

## ***Agradecimentos***

A **Deus**, pela sua presença maravilhosa em todos os momentos.

Aos meus pais, **Cláudio Lázaro Fernandes e Regina Célia Magno Fernandes**, pelo incentivo, apoio, paciência, dedicação, amor, carinho, respeito, por me ensinar tudo o que sei, a traçar caminhos certos e como os melhores valores, o meu profundo reconhecimento e eterna gratidão. Vocês são e serão meu “espelho”, tenho muito orgulho de ser filho de vocês. Amo vocês e muito obrigado!

Ao meu irmão, **Luciano**, que é uma pessoa muito especial, um amigo acima de tudo, uma pessoa que me ajudou muito a crescer que eu posso sempre contar em todos os momentos da minha vida.

À minha namorada, **Marília**, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, amizade, amor, carinho, respeito, dedicação. Você é uma pessoa maravilhosa, te amo!

À professora **Vânia D’Almeida**, que me acolheu em seu laboratório, que me ensinou a beleza que é fazer parte da pesquisa. Agradeço acima de tudo pelo seu carinho, pela confiança, paciência e ensinamentos.

## ***Resumo***

---



Sabe-se que o exercício físico regular proporciona uma série de benefícios ao praticante, tais como manutenção da saúde, melhoria da qualidade de vida e diminuição da incidência de uma série de doenças relacionadas com o estilo de vida. Em contrapartida, a interrupção de um programa de exercícios físicos em animais de experimentação foi associada ao ganho rápido de massa gorda. Recentemente, tornou-se evidente que os acontecimentos no útero e no início da vida podem desempenhar um papel importante na patogênese de doenças na vida adulta. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um programa de exercícios físicos em camundongos fêmeas treinadas, mantido ou interrompido após a fecundação e suas conseqüências no desenvolvimento fetal (perfil metabólico). Foram utilizadas camundongos fêmeas, as quais foram submetidas a um treinamento de 8 semanas e, tivemos também um grupo controle que permaneceu sem treinamento. Após isso, os animais foram submetidos à cópula, e as fêmeas com resultado positivo, verificado por meio do plugue vaginal, foram distribuídas em 3 grupos, sendo eles: grupo que manteve o treinamento na prenhez (TP); grupo que teve o treinamento interrompido após identificação do plugue vaginal (ITP), e o grupo controle (CTP), que não treinou em nenhum momento do experimento. Após nascimento, a prole foi pesada no 3º dia de vida sem separação de gênero. Com 30 dias os animais foram classificados em machos e fêmeas. Depois disso, a prole não sofreu nenhuma intervenção durante o desenvolvimento até atingir três meses de vida, quando os animais foram sacrificados por decapitação para coleta de tecido adiposo e sangue para realização das dosagens de leptina e insulina plasmáticas. Quando avaliado o peso da prole no 3º dia de vida pós-natal foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, de forma que o grupo de filhotes adultos cujas mães interromperam o treinamento na prenhez (IT) teve um menor peso quando comparado ao de filhotes adultos controles (CT) e filhotes adultos que as mães treinaram durante a prenhez (T) ( $p < 0,01$ ). Nos animais fêmeas, com 3 meses de vida, observamos novamente redução na massa corporal nos animais IT ( $p < 0,01$ ). Já os animais do grupo T tiveram aumento no peso do tecido adiposo ( $p = 0,03$ ), na concentração de leptina plasmática ( $p < 0,01$ ) e, uma tendência na insulina plasmática ( $p = 0,09$ ). Nos animais machos, observamos diferença somente na massa corporal no grupo T, verificado aumento do peso desses

animais ( $p<0,01$ ). Estes resultados sugerem que alterações no ambiente uterino, promovidas pelo treinamento ou pela interrupção do mesmo, podem levar a prejuízos futuros tanto na massa corporal dos animais, quanto no perfil metabólico, verificados no 3º mês de vida e, além disso, machos e fêmeas responderam de forma diferente mostrando que as mudanças observadas são dependentes do gênero.

**Palavras chaves:** Treinamento, destreinamento, prenhez, biometria, metabolismo, camundongos.

## ***Abstract***

---

Growing interest has been driven by the discovery of a tight relationship between prenatal manipulations and development of short- and long-term health disorders. In the current investigation we tested how swimming training (T) (8 weeks, 5 times/week, 1 h/day) of female mice before fecundation affects the metabolic profile of their offspring. We also investigated detraining (DT) effects during pregnancy in a group of animals. Three groups of pups were formed: one which T was maintained during pregnancy (TP); other which mothers were submitted to DT during pregnancy (DTP) and; a control group (C) of no trained mothers. At post-natal day 30 the animals were classified according to their genders. The offspring was weighted until the 3<sup>rd</sup> month of age, when mice were euthanized, perigonadal or periepididymal adipose tissue was weighted and blood was collected to measure leptin and insulin. The results had been analyzed by ANOVA followed Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Animals presented differences in body weight at the 3<sup>rd</sup> day of life ( $F_{(2, 145)}=27.72$ ), as well as, at post natal day 90 ( $F_{(2, 22)}=9.12$ ; DTP < DT and C). The TP female group presented higher adipose tissue weight ( $p=0.03$ ) and plasma leptin levels ( $p<0.01$ ) than animals of DTP and C. Concerning insulin, a tendency of augmentation was observed on TP group ( $p=0.09$ ). Among male mice, we only observed a difference on group T, in which animals were higher than the other groups. Our data suggest that physical activity or its interruption produce alterations on the intrauterine environmental which could result in long lasting offspring metabolic modifications.

**Key-words:** Training, detraining, pregnancy, biometric, metabolism, mice.

## ***Sumário***

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Efeitos do treinamento físico no período gestacional .....	2
1.2. Interrupção do treinamento .....	3
1.3. Leptina.....	5
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL.....	7
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1. Animais.....	12
4.2. Protocolo de treinamento .....	13
4.3. Controle da massa corporal .....	14
4.4. Determinação da massa e massa relativa do tecido adiposo.....	14
4.5. Determinações hormonais.....	15
4.5.1. Dosagem de Corticosterona plasmática.....	15
4.5.2. Dosagem de leptina plasmática .....	16
4.5.3. Dosagem de insulina plasmática.....	16
4.6. Análise dos resultados.....	16
4.6.1. Análise estatística.....	16
4.7. Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP .....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Resultados mães.....	19
5.1.1. Evolução ponderal durante aplicação do protocolo de treinamento de 8 semanas .....	19
5.1.2. Evolução ponderal de camundongos prenhez .....	19
5.1.3. Corticosterona materna (camundongos prenhez) .....	20
5.2. Resultados da prole sem separação de gênero .....	21
5.2.1. Peso da prole ao nascer.....	21
5.3. Resultados da prole - Fêmeas .....	22
5.3.1. Peso com 3 meses de vida .....	22
5.3.2. Peso do tecido adiposo .....	22
5.3.3. Peso relativo de gordura .....	23
5.3.4. Concentração de leptina plasmática.....	24
5.3.5. Concentração de insulina plasmática.....	24
5.4. Resultados da prole .....	25
5.4.1. Peso com 3 meses de vida .....	25
5.4.2. Peso do tecido adiposo .....	26
5.4.3. Peso relativo de gordura .....	26
5.4.4. Concentração de leptina plasmática.....	27
5.4.5. Concentração de insulina plasmática.....	28
6. DISCUSSÃO .....	29
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	37
8. REFERÊNCIAS.....	39
9. ANEXOS.....	48

## **1.INTRODUÇÃO**

Sabe-se que o exercício físico regular proporciona uma série de benefícios ao praticante, tais como manutenção da saúde, melhora da qualidade de vida e diminuição da incidência de uma série de doenças relacionadas com o estilo de vida (RADAK, CHUNG, NAITO *et al.*, 2004; RADAK, CHUNG e GOTO, 2005; RADAK, GOTO, NAKAMOTO *et al.*, 2005). No entanto, quando esse é praticado durante o período gestacional, seus efeitos no desenvolvimento da prole têm mostrado resultados conflitantes (OLIVEIRA, FILETO e MELIS, 2004).

Hipóteses apresentadas em estudos experimentais e com humanos defendem que o aumento do gasto energético provocado pelo exercício durante a gestação poderia acarretar em desenvolvimento inadequado da prole, como baixo peso ao nascer ou mesmo trabalho de parto prematuro (NAEYE e PETERS, 1982; PINTO e SHETTY, 1995). Por outro lado, pesquisas semelhantes não encontraram relação entre conseqüências indesejáveis à prole, como baixo peso ao nascer, e a prática de exercício no período gestacional (MUNOZ, LOPEZ-LUNA e HERRERA, 1999). Prováveis motivos pelos quais se encontram diferentes resultados quando avaliamos os efeitos da atividade física e o período gestacional em modelos experimentais são a variabilidade de intensidades de exercício a que as mães foram submetidas nos diferentes estudos, a familiaridade com o animal para o exercício físico ou a espécies distintas de animais utilizados (PIVARNIK, 1996).

Estudos mais recentes têm recomendado o exercício no período gestacional devido aos seus benefícios para a saúde, como por exemplo, a aptidão cardiovascular (TREUTH, BUTTE e PUYAU, 2005). As diretrizes do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG) recomenda que mulheres grávidas pratiquem exercícios regulares desde que não tenham nenhuma complicação obstétrica ou médica (ACOG, 2002). A recomendação atual é que as mulheres grávidas devem praticar exercícios moderados por 30 minutos ou mais, pelo menos 3 vezes na semana (TREUTH *et al.*, 2005).

### **1.1. Efeitos do treinamento físico no período gestacional**

Sabe-se que a atividade física aumenta a sensibilidade à insulina independentemente da redução do peso e de mudanças na composição



corporal, provavelmente devido ao aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular dos transportadores de glicose na musculatura esquelética (TERAN-GARCIA, RANKINEN, KOZA *et al.*, 2005). O último trimestre da gestação tem sido caracterizado por um aumento da resistência à insulina, tanto em mulheres (BURT, 1956; HOLLINGSWORTH, 1983; RYAN, O'SULLIVAN e SKYLER, 1985) como em animais experimentais (LETURQUE, FERRE, BURNOL *et al.*, 1986; MARTIN, ZORZANO, CARUNCHO *et al.*, 1986; HAUGUEL, GILBERT e GIRARD, 1987). Isso se deve à diminuição da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, principalmente do músculo esquelético (LETURQUE *et al.*, 1986; RAMOS e HERRERA, 1995), o que desencadeia alterações na função normal das células- $\beta$  pancreáticas, predispondo a mãe a desenvolver diabetes (CIARALDI, KETTEL, EL-ROEIY *et al.*, 1994). Assim, estratégias que diminuam este risco sem afetar o crescimento fetal ou o metabolismo, como é o caso de protocolos de exercícios moderados, seriam altamente desejáveis (MUNOZ *et al.*, 1999). Este tipo de atividade vem sendo aplicado com sucesso em grávidas diabéticas (JOVANOVIC-PETERSON e PETERSON, 1991).

O treinamento físico no estado não gestacional tem sido associado a um aumento da sensibilidade à insulina (KELLER, BEVIER, JOVANOVIC-PETERSON *et al.*, 1993; YAMANOUCHI, SHINOZAKI, CHIKADA *et al.*, 1995). Um estudo realizado por Muñoz e colaboradores (1999) demonstrou melhora na sensibilidade à insulina identificada após uma carga oral de glicose e diminuição nos níveis plasmáticos de insulina. O exercício agudo, em animais prenhas treinadas, também aumentou a captação de glicose na musculatura esquelética materna, sem comprometer a glicose absorvida pela placenta ou feto (MOTTOLA, MEZZAPELLI, SCHACHTER *et al.*, 1993).

## **1.2. Interrupção do treinamento**

Nos últimos anos, a redução no nível de atividade física tem sido apontada como um dos principais fatores que predispõem ao desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como a obesidade e diabetes melitus tipo 2 (BOOTH, CHAKRAVARTHY, GORDON *et al.*, 2002; HU, 2003). Há muitos anos, a interrupção de um programa de exercícios físicos em animais de

experimentação está sendo associada ao ganho rápido de massa gorda (DOHM, BARAKAT, TAPSCOTT *et al.*, 1977; CRAIG, THOMPSON e HOLLOSZY, 1983). Além disso, estudos demonstraram que a sensibilidade à insulina decresce em alguns dias quando indivíduos fisicamente ativos se tornam sedentários (HOUMARD, TYNDALL, MIDYETTE *et al.*, 1996; ARCIERO, SMITH e CALLES-ESCANDON, 1998). Em estudos mais recentes, com humanos, a interrupção do exercício físico combinado a uma dieta com alto teor de gordura, constituiu um estímulo para o desenvolvimento de obesidade (SHEPARD, WEIL, SHARP *et al.*, 2001; PETIBOIS, CASSAIGNE, GIN *et al.*, 2004). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que após a interrupção do treinamento algumas variáveis metabólicas são mantidas, por exemplo, níveis plasmáticos de ácidos graxos livres, maior infusão de gorduras no fígado e adipócitos (YASARI, PAQUETTE, CHARBONNEAU *et al.*, 2006). O aumento da infusão lipídica pode ser explicado pelos efeitos que o exercício propicia, tais como aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica (CRAIG *et al.*, 1983; LAMBERT, WOODING, LAMBERT *et al.*, 1994). No entanto, apesar de plausível a hipótese de que a oxidação de gordura está aumentada em virtude dos efeitos do programa de treinamento, esta adaptação, após a cessação do exercício, é progressivamente diminuída (YASARI, DUFRESNE, PRUD'HOMME *et al.*, 2007). Quanto ao metabolismo de carboidratos, um estudo realizado por Kawanaka e colaboradores (1997), demonstrou que após um período de treinamento, os animais tinham aumento da concentração de GLUT-4 no músculo e melhora na sensibilidade à insulina. No entanto, estes resultados eram revertidos após 90h da interrupção do treinamento.

A influência do término do treinamento no balanço energético foi investigada por alguns pesquisadores, que notaram que a redução na atividade física não é acompanhada por redução na ingestão calórica e resulta, portanto num balanço energético positivo favorecendo o acréscimo do peso corporal (SCHULZ e SCHOELLER, 1994; MURGATROYD, GOLDBERG, LEAHY *et al.*, 1999). Dessa forma, sabe-se que a inatividade física pode levar a um estado de ganho de peso e diminuição da sensibilidade à insulina. No entanto, os motivos que desencadeiam estes efeitos em indivíduos saudáveis, poucos dias após o destreinamento, ainda não foram elucidados, principalmente quando este ocorre no período gestacional, podendo levar a inúmeros prejuízos ao

desenvolvimento da prole. Em um ponto de vista clínico, observa-se a importância da atividade física para evitar aumentos na gordura abdominal e diversas doenças associadas como a diabetes (HILL, WYATT, REED *et al.*, 2003). O entendimento dos mecanismos moleculares de resistência à insulina e obesidade envolvidos com o destreinamento físico é fundamental para a prevenção da diabetes do tipo 2 e para a busca de medidas terapêuticas eficazes.

### 1.3. Leptina

A leptina é um hormônio codificado pelo gene *Ob*, que é expresso principalmente nos adipócitos, e atua como um fator de sinalização entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético e, conseqüentemente, a massa corporal (ZHANG, PROENCA, MAFFEI *et al.*, 1994; CAMPFIELD, SMITH, GUISEZ *et al.*, 1995; CINTI, FREDERICH, ZINGARETTI *et al.*, 1997). Pode também ser produzida, em menor quantidade, no estômago (BADO, LEVASSEUR, ATTOUB *et al.*, 1998), na placenta (MASUZAKI, OGAWA, SAGAWA *et al.*, 1997) e no tecido adiposo marrom (CINTI *et al.*, 1997). Possui 6 tipos de receptores e sua isoforma longa (Ob-Rb) é altamente expressa em núcleos hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o controle do gasto energético (MERCER, HOGGARD, WILLIAMS *et al.*, 1996). Mais especificamente, as regiões ventro-basais do hipotálamo (núcleos arqueados, ventro-medial e dorso-medial) contêm as maiores concentrações do receptor Ob-Rb (SCHWARTZ, SEELEY, CAMPFIELD *et al.*, 1996).

A interação da leptina com seu receptor se dá no contexto dos neurônios produtores de neuropeptídeos que alteram o comportamento alimentar. Particularmente, a leptina tem relação com alguns peptídeos específicos: o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo relacionado à cepa agouti (AgRP), a pró-opiomelanocortina (POMC) e o hormônio liberador de corticotropina (CRH).

Estudos demonstraram que a obesidade está associada com alterações nas concentrações circulantes de leptina, analisando esse aumento em indivíduos obesos em relação aos valores verificados em eutróficos. Com isso, verifica-se que quanto maior a concentração de tecido adiposo haverá grandes

quantidades de secreção desse hormônio, aumentando, assim, sua concentração circulante (MAFFEI, HALAAS, RAVUSSIN *et al.*, 1995; CONSIDINE, SINHA, HEIMAN *et al.*, 1996; DE SILVA, DE COURTEN, ZIMMET *et al.*, 1998).

A realização de exercício físico em alta intensidade pode diminuir a concentração circulante desse hormônio, todavia, exercícios efetuados em baixa intensidade não resultaram no mesmo efeito (LANDT, LAWSON, HELGESON *et al.*, 1997). Entretanto, a relação entre o exercício físico e a concentração plasmática de leptina não está clara, devido a alguns estudos mostrarem redução dos níveis desse hormônio enquanto outros não encontram qualquer alteração (DE SILVA *et al.*, 1998).

## **2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL**

Ao observarmos a realidade do mundo contemporâneo, verificamos o aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas como obesidade e a resistência à insulina. Uma vez que o desenvolvimento destas doenças ocorra no período gestacional, impactos negativos podem ser esperados no desenvolvimento fetal. Por outro lado, a prática de exercícios físicos vem se mostrando relevante no tratamento destas enfermidades.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um programa de exercício físico em camundongos fêmeas treinadas, mantido após a fecundação e suas consequências no desenvolvimento fetal. Além disso, verificamos se os efeitos do treinamento são mantidos se houver interrupção da prática de exercícios durante o período gestacional, bem como a possível repercussão sobre os filhotes.

### **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o ganho de peso nas mães para identificação do efeito do programa de exercício físico, assim como o efeito da interrupção do treinamento no período gestacional;
- Acompanhar o ganho de peso corporal dos animais cujas mães foram submetidas a um programa de exercícios em períodos diferentes (antes e durante a gestação, ou somente antes), quantificar a gordura abdominal e correlacionar os dois parâmetros;
- Avaliar a expressão do gene da leptina em tecido adiposo;
- Quantificar os níveis plasmáticos de leptina e correlacionar com os resultados de expressão gênica;
- Quantificar os níveis plasmáticos de corticosterona como indicador da participação do estresse nas alterações corporais;
- Quantificar os níveis plasmáticos de insulina para correlacionar com outras variáveis metabólicas desses animais;
- Correlacionar os resultados referentes ao peso corporal e da gordura com a expressão do gene da leptina.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1. Animais

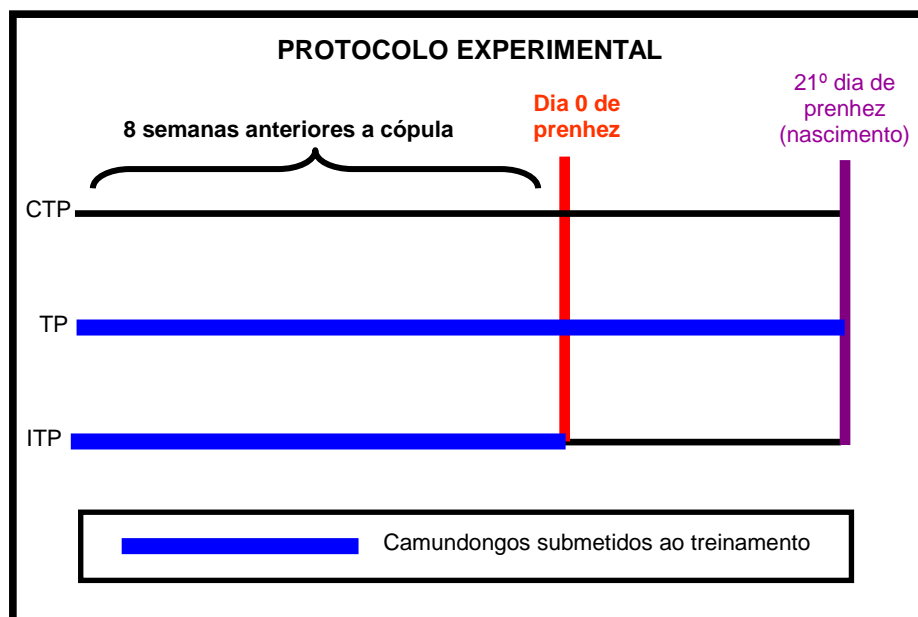
Foram utilizados camundongos fêmeas adultas ( $n = 8$  por grupo experimental) da mesma linhagem (Swiss) provenientes do Biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em um ciclo de claro-escuro de 12 h (7:00-19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento.

Camundongos fêmeas adultas foram selecionadas de acordo com o ciclo estral (MAEDA, OKHURA e TSUKAMURA, 2000) e submetidas a um programa de exercício físico de 8 semanas (KREGEL, ALLEN, BOOTH *et al.*, 2006).

Após o condicionamento adquirido pelos animais por meio da prática de exercícios, as fêmeas foram colocadas com um animal macho para cruzamento e realizamos esfregaço vaginal para verificação da ocorrência de cópula. As fêmeas com resultados positivos foram distribuídas em dois grupos: o primeiro deu continuidade ao programa de treinamento na prenhez (TP); o segundo, após a identificação do resultado positivo de cópula, teve o treinamento suspenso (interrupção de treinamento na prenhez - ITP). Ainda, tivemos um grupo controle (CTP) de mães que não foi submetido à prática de exercícios. Para melhor entendimento da divisão dos grupos e do protocolo experimental segue abaixo (Quadro 1 explicativo). A manipulação foi realizada no período das 8 às 10 horas. No período que corresponde ao início do terceiro trimestre de gestação em humanos (em torno do 15º dia de prenhez), foi realizada uma coleta de sangue das mães para avaliação dos níveis de corticosterona e, posteriormente, as mesmas continuaram sua prenhez normalmente.

Após o nascimento, cada grupo de animais foi avaliado, medido e pesado semanalmente até atingir a idade adulta (2,5 a 3 meses de idade). Os animais foram sacrificados por decapitação e, as fêmeas, foram todas sacrificadas na mesma fase do ciclo estral (diestro) para, dessa forma, minimizar as influências que a variação nos níveis dos hormônios sexuais pudessem produzir nos parâmetros estudados.

**Quadro 1** – Protocolo experimental. Grupo controle (CTP); Grupo treinado antes e durante a prenhez (TP); Grupo treinado com interrupção do treinamento na prenhez (ITP).



#### 4.2. Protocolo de treinamento

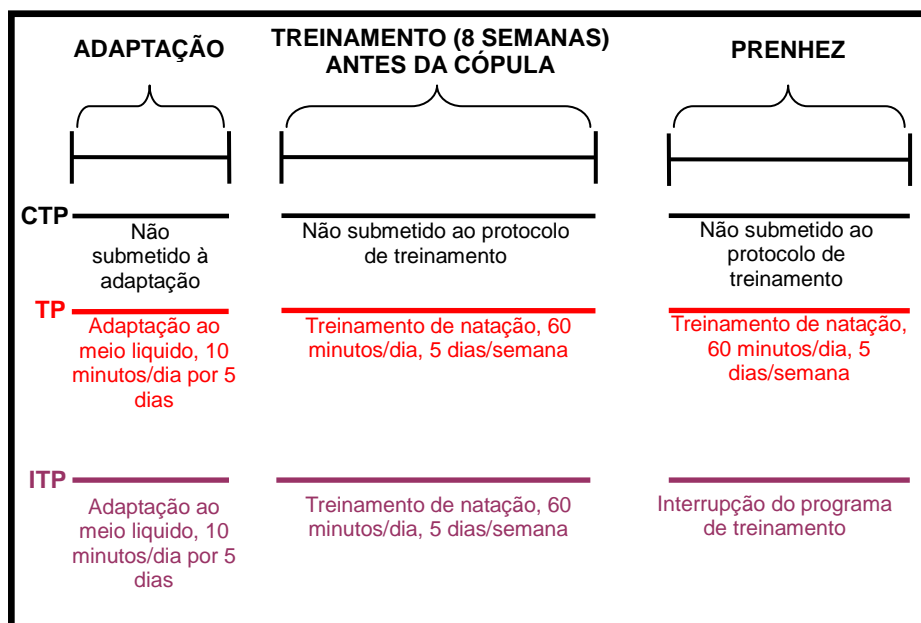
O protocolo de exercício consistiu em natação, individual, realizado em recipientes plásticos com diâmetro externo de 60 cm. O reservatório interno foi de 15 cm de diâmetro e 35 cm de profundidade para que cada animal pudesse nadar em uma área definida. A temperatura da água foi mantida entre 32 °C e 36 °C, por ser considerada termicamente neutra aos animais.

Os camundongos foram familiarizados com o tanque de natação antes do início do estudo. Assim, foram colocados no tanque permitindo que nadassem 10 minutos/dia durante 5 dias consecutivos. Esse procedimento permitiu aos animais a aclimação para minimizar o estresse da tarefa. Além disso, o tempo de familiarização não excedeu 10 minutos para evitar adaptações ao exercício.

Após o período de aclimação os grupos TP e ITP nadaram 1 hora/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas (ver esquema Quadro 2). Após 8 semanas, o grupo TP continuou o treinamento no período de prenhez, enquanto que o grupo ITP teve seu treinamento interrompido. O referido programa de treinamento de natação é um exercício que recruta um grande volume de

massa muscular e produz extensas adaptações ao sistema metabólico e cardiovascular (Kregel et al., 2006).

**Quadro 2** – Protocolo de treinamento



### 4.3. Controle da massa corporal

A determinação da massa corporal foi realizada entre uma e três horas após o ascender das luzes. A pesagem dos animais foi realizada colocando-os em um recipiente plástico circular ( $\varnothing$ :15cm) de 20 cm de altura. A balança utilizada foi da marca KERN (Kern & Sohn, modelo 440-45), com a precisão de 0,1g.

### 4.4. Determinação da massa e massa relativa do tecido adiposo

Para a avaliação da massa do órgão foi utilizada uma balança analítica (Bioprecisa, Modelo-FA2104N), com precisão de 0,0001g. Imediatamente após o sacrifício, o animal foi colocado em decúbito dorsal e a pele da região abdominal foi rebatida. Em seguida, abriu-se a cavidade abdominal e cuidadosamente removemos todo o tecido adiposo (hemi-lateral). O cálculo para obtenção da massa adiposa relativa foi realizado por meio da porcentagem de tecido adiposo levando em consideração o peso total do

animal. Dessa forma constituíram-se os 3 grupos experimentais de filhotes adultos, sendo eles: prole controle (CT); prole cuja mãe treinou na prenhez (T) e, prole cuja mãe interrompeu o treinamento na prenhez (IT).

#### 4.5. Determinações hormonais

Para a determinação das concentrações séricas dos hormônios corticosterona, insulina e leptina, alíquotas de sangue foram coletadas em tubo com heparina (Becton, Dickinson and Company) e centrifugados a 25°C, 2000g por 10 min (Sorvall RT 6000B). O plasma obtido foi aliqotado e armazenado a -80°C até o ensaio.

##### 4.5.1. Dosagem de Corticosterona plasmática

A corticosterona plasmática foi quantificada por meio de radioimunoensaio utilizando o “*ImmuChem™ Double Antibody Corticosterone* <sup>125</sup>I *RIA Kit*”, (MP Biomedicals, NY, USA)

Para realizar a análise quantitativa, construiu-se uma curva de calibração com 7 pontos (em concentrações crescentes de 0 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL e 1000 ng/mL). Por interpolação obtivemos a equação correspondente à quantificação dos níveis de corticosterona plasmáticos no ensaio.

As amostras foram diluídas em 1:200 com diluente esteróide (10µL de amostra + 1900µL de diluente esteróide). Em tubos devidamente identificados foram pipetados 100µL dos pontos da curva de calibração ou das amostras, em duplicata. Foram adicionados 200µL de corticosterona <sup>125</sup>I, 200µL de Anti-corticosterona a cada tubo e posteriormente, agitados com auxílio de um agitador de tubos tipo vórtex por 10 segundos. Os tubos foram incubados por 2 horas a 22 ± 1°C. Após esse tempo, foram adicionados 500µL de Solução de Precipitação, agitados com auxílio de um agitador de tubos tipo vórtex por 10 segundos e posteriormente, centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. Por fim, os tubos foram delicadamente invertidos em papel absorvente a fim de secarem completamente. As amostras foram analisadas em um contador gamma calibrado para <sup>125</sup>I (Auto-Gamma® counting systems – Cobra™ II

Series. Packard) Os resultados das amostras foram expressos em ng/mL.

#### **4.5.2. Dosagem de leptina plasmática**

A leptina foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) usando-se um kit (Cat. # EZML-82K), comercialmente disponível (Millipore).

Para realizar a análise quantitativa, construiu-se uma curva de calibração com 8 pontos (em concentrações crescentes de 0,2 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL e 30 ng/mL). Por interpolação obtivemos a equação correspondente à quantificação dos níveis de leptina plasmáticos no ensaio.

As amostras foram quantificadas utilizando-se um fluorímetro (SpectraMax M2, Molecular Devices) com absorbância a 450 nm e 590 nm. Os resultados das amostras foram expressos em ng/mL.

#### **4.5.3. Dosagem de insulina plasmática**

A insulina foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) usando-se um kit (Cat. # EZRMI-13K), comercialmente disponível (Millipore).

Para realizar a análise quantitativa, construiu-se uma curva de calibração com 6 pontos (em concentrações crescentes de 0,2 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL). Por interpolação obtivemos a equação correspondente à quantificação dos níveis de insulina plasmáticos no ensaio.

As amostras foram quantificadas utilizando-se um fluorímetro (SpectraMax M2, Molecular Devices) com absorbância a 450 nm e 590 nm. Os resultados das amostras foram expressos em ng/mL.

### **4.6. Análise dos resultados**

#### **4.6.1. Análise estatística**

Os resultados do peso corporal durante aplicação do protocolo de treinamento e durante a prenhez (mães) foram avaliados por análise de

variâncias (ANOVA) de medidas repetidas seguido do teste de Tukey, quando necessário; os resultados de corticosterona materna, peso da prole no 3º e 90º dia, leptina e insulina plasmáticas foram analisados por ANOVA de uma via seguidos do teste de Tukey, para verificar possíveis diferenças dos grupos experimentais em relação ao grupo controle e entre eles. Os dados foram representados pela média  $\pm$  erro padrão ou porcentagem. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . O programa STATISTICA 6.0 foi empregado para efetuar as análises dos dados.

#### **4.7. Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP**

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM, nº 1225/06 (anexo).

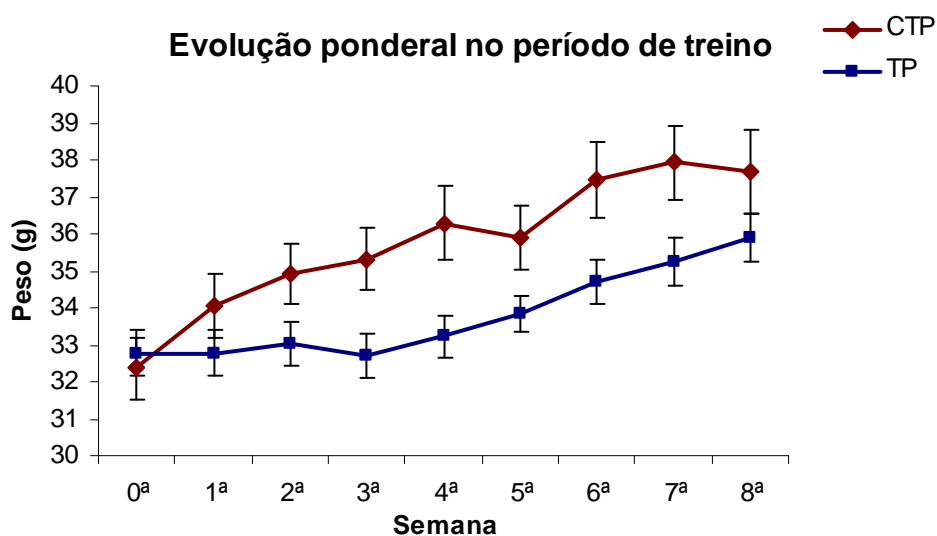
## **5. RESULTADOS**



## 5.1. Resultados mães

### 5.1.1. Evolução ponderal durante aplicação do protocolo de treinamento de 8 semanas

O gráfico 1 representa a evolução ponderal de animais fêmeas submetidas ao protocolo de treinamento de 8 semanas. O teste ANOVA demonstrou diferença estaticamente significativa entre o grupo que treinou e o controle (sedentário) quando avaliada a interação do tempo com a evolução do peso corporal dos animais ( $F_{(14, 448)}=4,3651$ ,  $p<0,001$ ). No entanto, quando realizado o teste *post-hoc* de Tukey, em dias pontuais, não observamos diferenças entre os grupos. Apesar disso, é possível observar que o grupo treinado apresentou valores inferiores de peso ao longo das 8 semanas de treinamento.

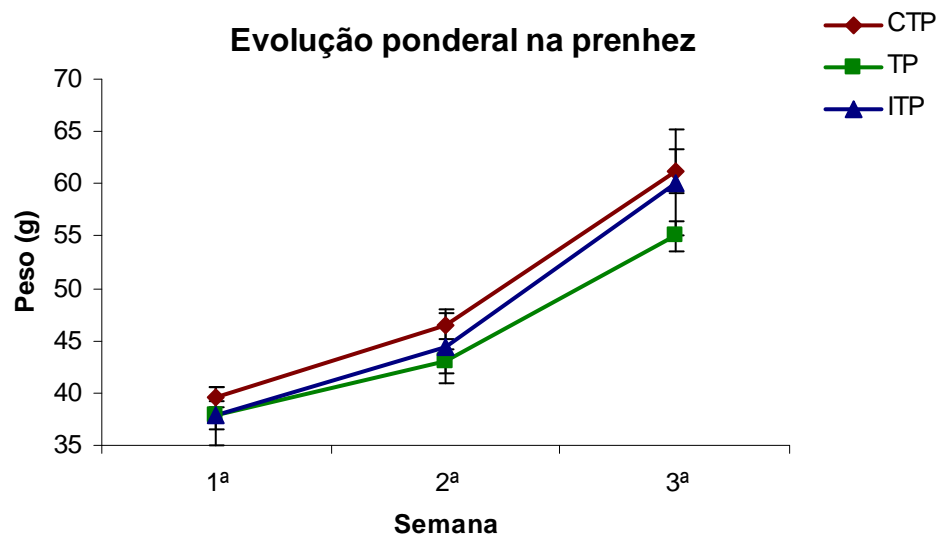


**Gráfico 1** – Representação do peso corporal comparando animais submetidos a um programa de treinamento (TP) de 8 semanas com o grupo controle (CTP). (N= 15 por grupo). Resultados apresentados pela Média  $\pm$  EP.

### 5.1.2. Evolução ponderal de camundongos prenhez

Quando avaliada a evolução ponderal dos animais durante o período de prenhez foi observado diferença significativa entre os grupos ( $F_{(4, 26)}=3,2953$ ,  $p=0,026$ ). No entanto, quando realizado o teste *post-hoc* de Tukey, em dias pontuais, não observamos diferenças entre os grupos. O que é interessante

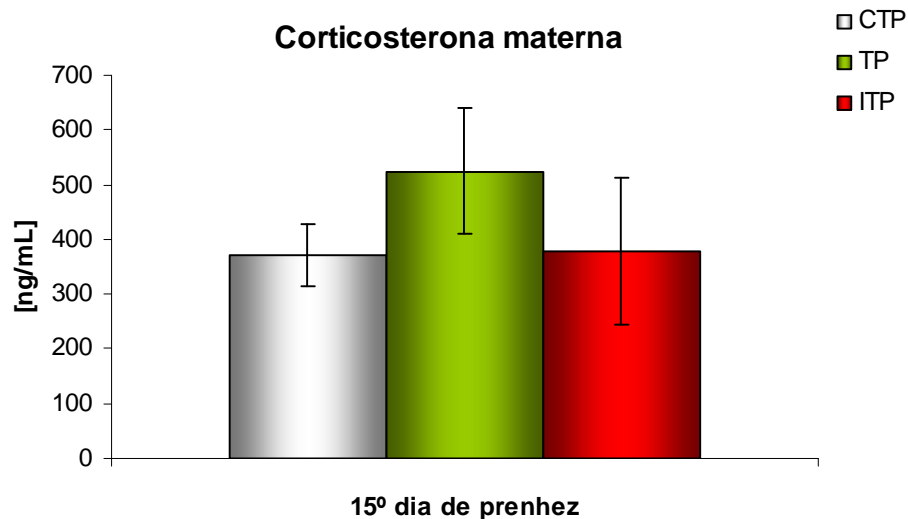
observar nesse gráfico é que o grupo que interrompeu o treinamento passou a ganhar peso assim como o grupo controle (sedentário), e o grupo que manteve o treinamento, permaneceu o período de prenhez ganhando menos peso que o grupo controle da mesma forma que no período de aplicação do protocolo de treinamento de 8 semanas, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa.



**Gráfico 2** – Representação do peso corporal comparando animais submetidos a um programa de treinamento durante a prenhez (TP), interrupção do treinamento na prenhez (ITP) e grupo controle (CTP). (N= 4–7 por grupo). Resultados apresentados pela Média  $\pm$  EP.

### 5.1.3. Corticosterona materna (camundongos prenhez)

A dosagem de corticosterona, importante marcador de estresse, foi realizada com o objetivo de verificar se possíveis alterações observadas na prole estão associadas a aspectos psicofisiológicos da manipulação ou do treinamento na prenhez, o que poderia levar a posteriores alterações na prole. A dosagem dos níveis de corticosterona plasmática foi realizada no 15º dia de prenhez, após a permanência da aplicação do treinamento ou interrupção do mesmo (Figura 03). Como pode ser observado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $F_{(2, 10)}=,78547$ ,  $p=0,482$ ).



**Gráfico 3** – Avaliação da concentração plasmática de corticosterona em camundongos prenhes que foram submetidos a um programa de treinamento durante a prenhez (TP), interromperam o treinamento na gestação (ITP) e grupo controle (CTP). (N= 3-5 por grupo). Resultados apresentados pela Média  $\pm$  EP.

## 5.2. Resultados da prole sem separação de gênero

### 5.2.1. Peso da prole ao nascer

Quando verificado o peso da prole no 3º dia de vida pós-natal (Gráfico 4), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $F_{(2, 145)}=27,72$ ,  $p<0,001$ ). O grupo IT teve um menor peso quando comparado ao grupo controle (CT) ( $p<0,001$ ) e grupo T ( $p<0,001$ ).

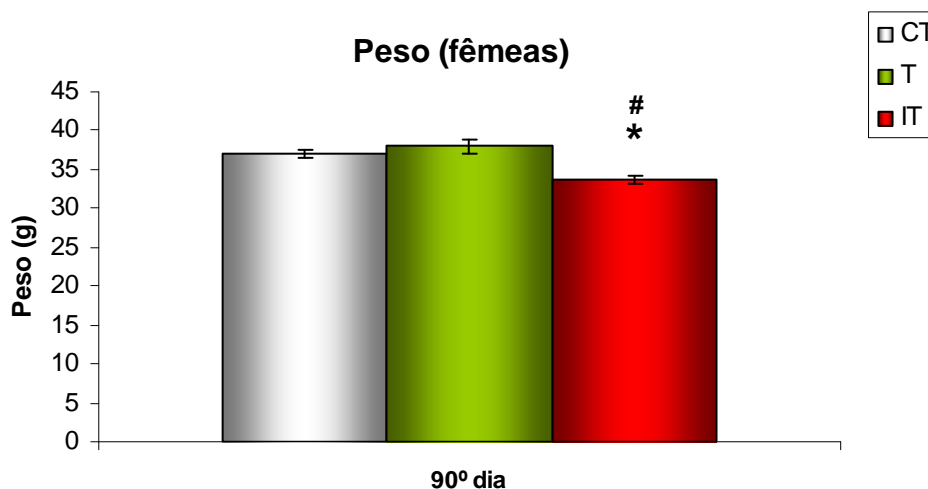


**Gráfico 4** – Representação do peso corporal de animais no 3º dia de vida após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 40 por grupo). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP. \* Diferente do grupo controle; # Diferença entre grupos. CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

### 5.3. Resultados da prole - Fêmeas

#### 5.3.1. Peso com 3 meses de vida

Quando avaliado o peso corporal dos animais fêmeas adultos (3 meses de idade), verificamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $F_{(2, 22)}=9,1207$ ,  $p<0,001$ ), sendo que o grupo IT teve um menor ganho de peso quando comparado ao CT ( $p=0,006$ ) e, também ao grupo T ( $p=0,002$ ).

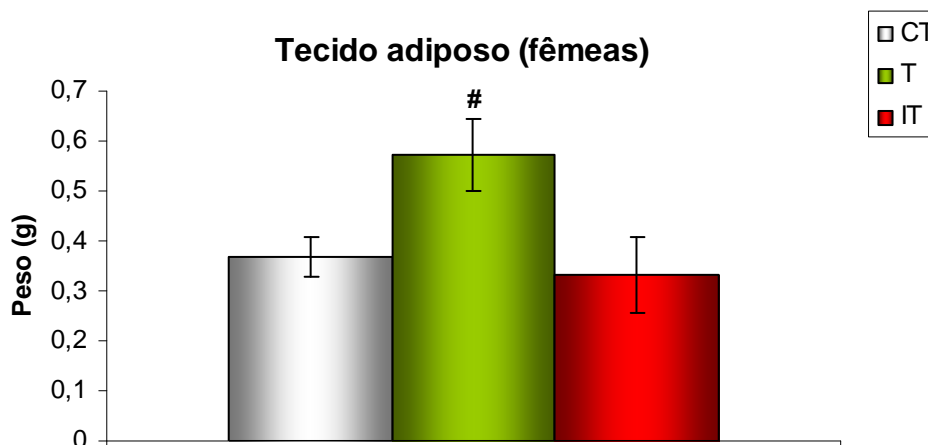


**Gráfico 5** – Representação do peso corporal de animais fêmeas no 90º dia de vida pós-natal, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 6-11 por grupo). Amostras apresentadas pela Média ± EP. \* Diferente do grupo controle; # Diferença entre grupos.

CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

#### 5.3.2. Peso do tecido adiposo

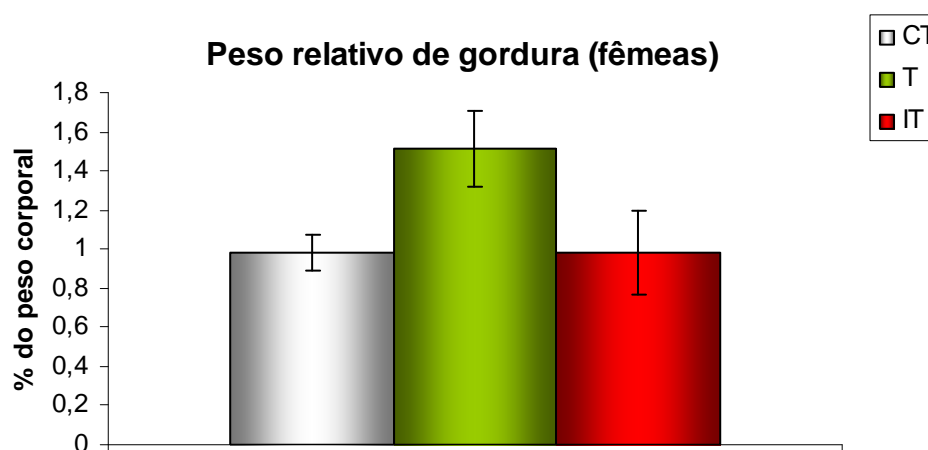
Quando avaliado o peso do tecido adiposo absoluto, como um parâmetro de alteração metabólica nos filhotes decorrente da prática de exercícios ou da interrupção do mesmo na prenhez, observamos diferença significativa entre os grupos ( $F_{(2, 22)}=4,3124$ ,  $p=0,026$ ). Assim, observamos que o grupo T diferiu do grupo IT, tendo um aumento de tecido adiposo perigonadal ( $p=0,03$ ).



**Gráfico 6** – Representação do peso do tecido adiposo perigonadal de camundongos fêmeas adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 6-11). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP. # Diferença entre grupos. CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

### 5.3.3. Peso relativo de gordura

O Gráfico 7 mostra a porcentagem da massa de tecido adiposo perigonadal em relação à massa do animal após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle.

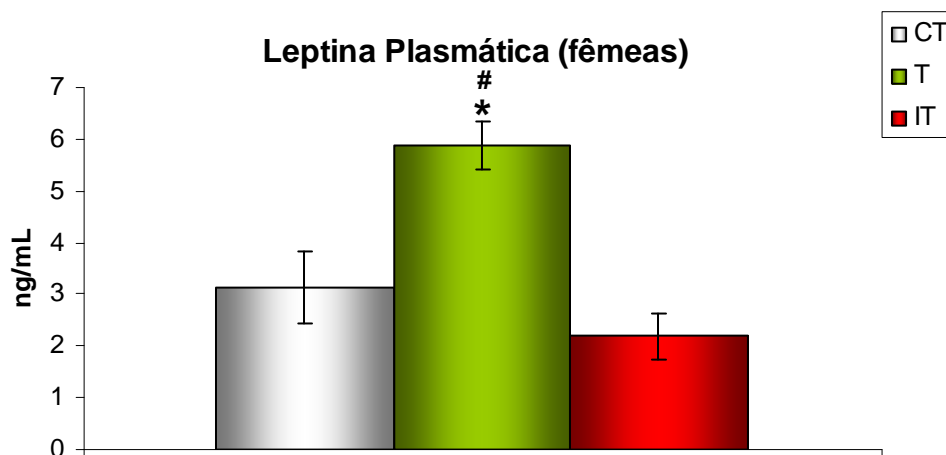


**Gráfico 7** – Representação da massa relativa do tecido adiposo perigonadal de camundongos fêmeas adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N=6-11). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP. CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

Nesse parâmetro, foram observadas diferenças entre grupos ( $F_{(2, 22)}=3,4556$ ,  $p=0,049$ ). No entanto, quando realizado o teste *post-hoc* de Tukey, observamos somente uma tendência de aumento da massa adiposa relativa do grupo treinado em relação ao grupo CT ( $p=0,06$ ) e IT ( $p=0,09$ ), respectivamente.

#### 5.3.4. Concentração de leptina plasmática

O gráfico 8 representa a concentração de leptina plasmática de camundongos fêmeas adultos. Quando realizado teste ANOVA verificamos diferença entre os grupos ( $F_{(2, 13)}=9,0634$ ,  $p=0,003$ ), sendo que o grupo T diferiu tanto do grupo controle ( $p<0,01$ ), quanto do grupo IT ( $p<0,01$ ).

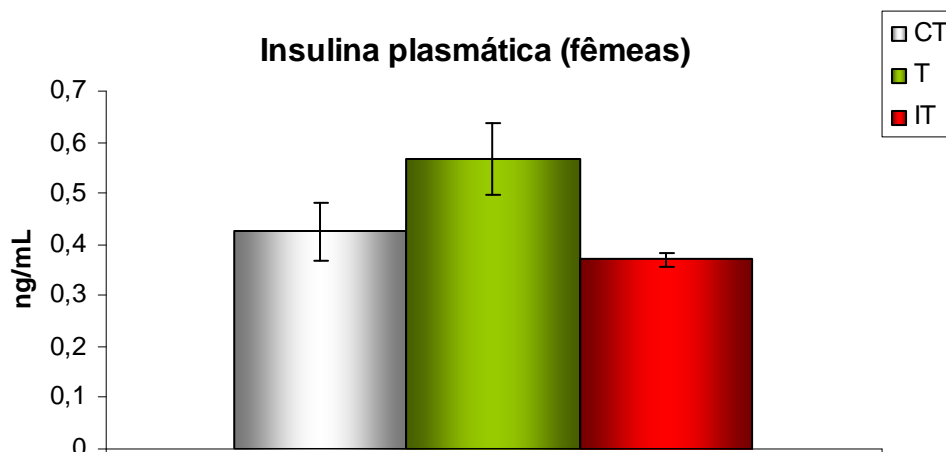


**Gráfico 8** – Representação da concentração plasmática de leptina de camundongos fêmeas adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 6 por grupo). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP. \* Diferente do grupo controle; # Diferença entre grupos.

CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

#### 5.3.5. Concentração de insulina plasmática

O gráfico 9 representa a concentração de insulina plasmática de camundongos fêmeas adultos. Quando realizado teste ANOVA verificamos diferença significativa ( $F_{(2, 14)}=3,9097$ ,  $p<0,05$ ). No entanto, quando realizado um teste *post-hoc* de Tukey, verificamos apenas uma tendência entre o grupo T em relação ao grupo CT ( $p=0,09$ ) e IT ( $p=0,06$ ).

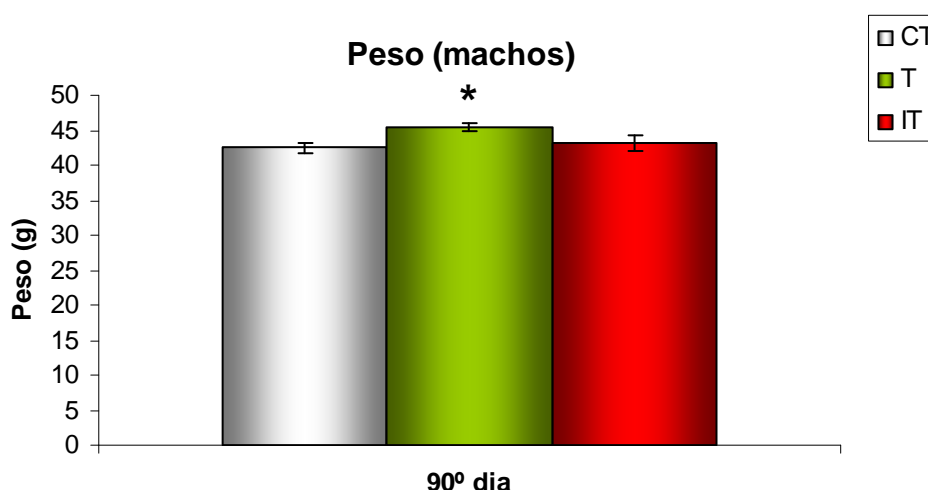


**Gráfico 9** – Representação da concentração plasmática de insulina de camundongos fêmeas adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 5-6 por grupo). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP.  
CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

## 5.4. Resultados da prole - Machos

### 5.4.1. Peso com 3 meses de vida

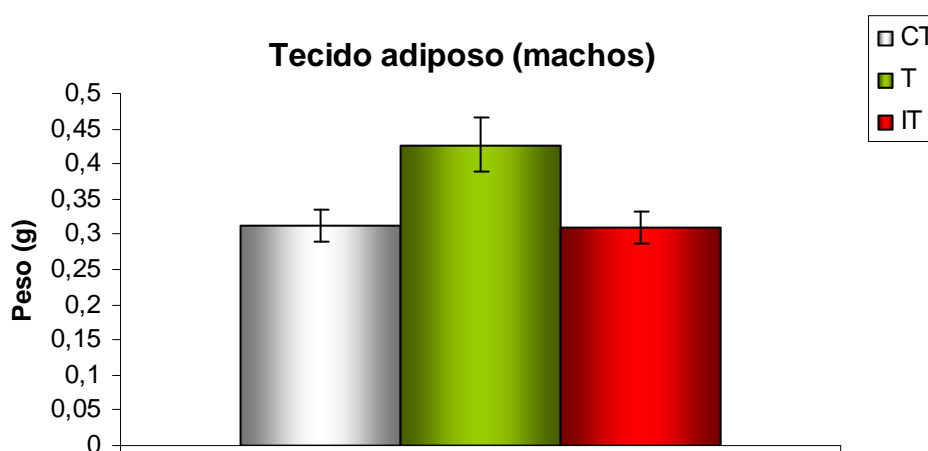
O Gráfico 10 representa o peso corporal dos animais com 3 meses de idade. Verificamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $F(2, 43)=4,3477$ ,  $p=0,02$ ), de forma que o grupo T teve um maior peso corporal quando comparado ao controle ( $p<0,01$ ).



**Gráfico 10** – Representação do peso corporal de animais machos no 90º dia de vida pós-natal, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 9-19 por grupo). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP.  
CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

#### 5.4.2. Peso do tecido adiposo

O gráfico 11 representa o peso de tecido adiposo periepídidimo de camundongos machos os quais as mães foram submetidas a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. Quando realizado o teste ANOVA para avaliação da diferença entre o peso do tecido adiposo periepídidimo entre os grupos encontramos um valor de  $F_{(2, 43)}=3,5168$ ,  $p=0,04$ . Contudo, quando realizamos um teste *post-hoc* de Tukey, verificamos somente tendência entre o grupo T em relação ao grupo CT ( $p=0,06$ ).

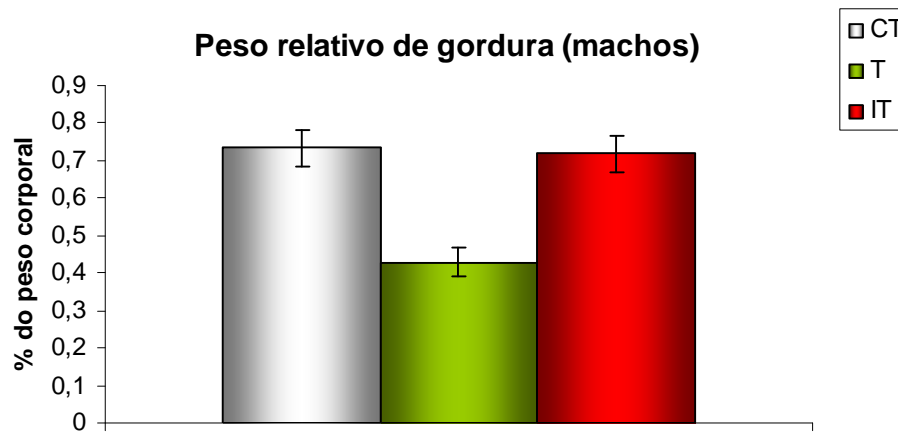


**Gráfico 11** – Representação do peso do tecido adiposo periepídidimo de camundongos machos adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 9-19 por grupo). Amostras apresentadas pela Média ± EP.  
CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

#### 5.4.3. Peso relativo de gordura

O Gráfico 12 mostra a porcentagem da massa de tecido adiposo periepídidimo em relação à massa do animal após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. Nesse parâmetro, observamos diferença no teste ANOVA ( $F_{(2, 43)}=3,5168$ ;  $p=0,038$ ) e apenas uma tendência de diminuição entre os grupos (CT x T =  $p=0,06$ ).

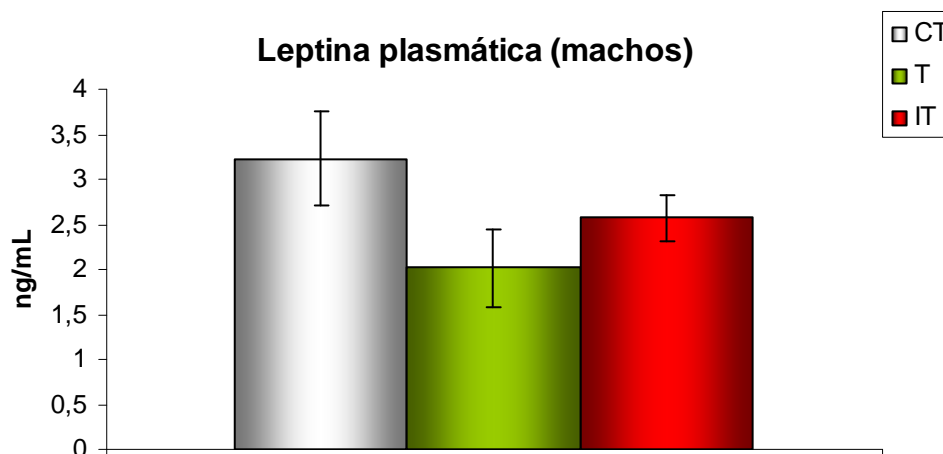




**Gráfico 12** – Representação da massa relativa do tecido adiposo periepididimal de camundongos machos adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 9-11). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP. CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

#### 5.4.4. Concentração de leptina plasmática

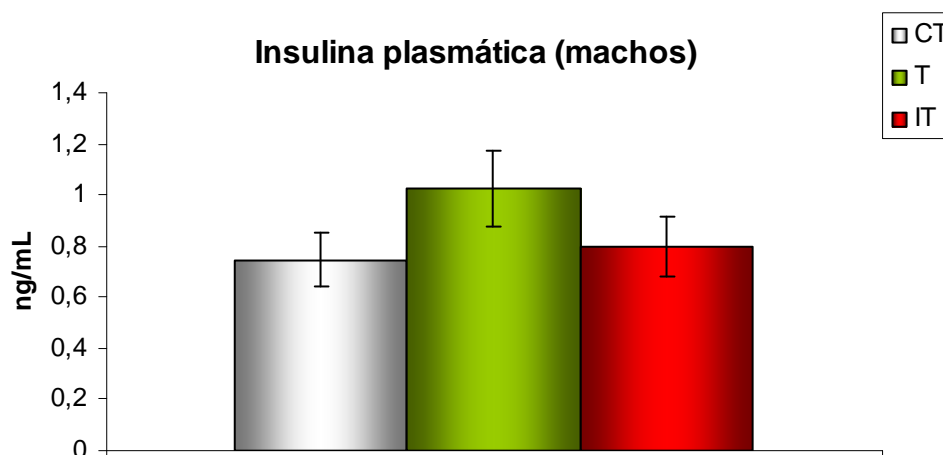
Quando avaliada a concentração de leptina plasmática, demonstrada no gráfico 13, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de camundongos machos adultos cujas mães foram submetidas a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle ( $F_{(2, 15)}=1,5472$ ,  $p=0,24$ ).



**Gráfico 13** – Representação da concentração plasmática de leptina de camundongos machos adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 6-7 por grupo). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP. CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

#### 5.4.5. Concentração de insulina plasmática

O gráfico 14 mostra a concentração plasmática de insulina em camundongos machos adultos. Quando realizado o teste ANOVA verificamos diferença estaticamente significativa entre os grupos ( $F_{(2, 17)}=0,94$ ,  $p=0,41$ ).



**Gráfico 14** – Representação da concentração plasmática de insulina de camundongos machos adultos, após submissão de suas mães a um protocolo de treinamento antes e durante a gestação, somente antes da gestação com a interrupção do treinamento e controle. (N= 7 por grupo). Amostras apresentadas pela Média  $\pm$  EP.

CT= controle; T= treinado; IT= interrupção do treinamento.

## **6. DISCUSSÃO**

Hoje uma das principais doenças crônicas que afligem a sociedade é a obesidade, sendo considerada um problema de saúde pública. Juntamente com isso, cresce o número de mulheres em idade fértil que tem sobrepeso ou mesmo obesidade (CATALANO e EHRENBURG, 2006; PARENTE, AGUILA e MANDARIM-DE-LACERDA, 2008), o que tem contribuído de forma significativa para o nascimento de filhos com maior quantidade de gordura corporal (SEWELL, HUSTON-PRESLEY, SUPER *et al.*, 2006). Um dos principais aspectos relacionados ao aumento da incidência dessa doença, tanto na população geral (MOORE, 2000; BOOTH *et al.*, 2002; HU, 2003) quanto em gestantes (HAAS, JACKSON, FUENTES-AFFLICK *et al.*, 2005) é a inatividade física. Fell e colaboradores (2009) em um estudo de coorte retrospectivo com mulheres canadenses mostrou que 40% das mulheres após a descoberta da gravidez deixam de praticar exercício, o que é um aspecto relevante que pode contribuir para o desenvolvimento inadequado da prole.

Nesse sentido, vários estudos vêm sendo realizados para demonstrar as consequências das manipulações no período pré-natal em parâmetros biométricos (KAPOOR, DUNN, KOSTAKI *et al.*, 2006) e bioquímicos (BARKER e CLARK, 1997; BUDGE, STEPHENSON e SYMONDS, 2007) na prole adulta. Intervenções realizadas no início da vida, como dieta e exercício físico, vêm sendo sugeridas por alguns pesquisadores como estratégias importantes visando redução da suscetibilidade do indivíduo ao ganho de peso na vida adulta e, além disso, aumento da probabilidade de respostas favoráveis à dieta e exercício, caso haja necessidade (MUHLHAUSLER e SMITH, 2009). Com isso, este estudo objetivou verificar as consequências da continuidade ou interrupção do treinamento durante o período de prenhez em camundongos e os efeitos na prole quando esta atinge a vida adulta (programação fetal).

O termo "programação" tem sido utilizado para descrever o processo pelo qual a manipulação exercida durante períodos críticos ou sensíveis do desenvolvimento pode, em longo prazo, causar alterações das estruturas e funções do organismo e comprometer o futuro da saúde dos indivíduos (LUCAS, 1994; GLUCKMAN e HANSON, 2004; INGELFINGER, 2004; GLUCKMAN, HANSON e PINAL, 2005; GLUCKMAN, HANSON, SPENCER *et al.*, 2005). Nosso estudo mostrou que manipulações no ambiente uterino como o treinamento e a interrupção do treinamento levaram a alterações

permanentes em suas respectivas proles (resultados encontrados com 3 meses de vida). Pudemos verificar alterações na massa corporal dos animais, alterações na gordura absoluta e relativa e no perfil hormonal (insulina e leptina).

Este estudo mostrou ainda que o treinamento de 8 semanas antes do cruzamento das fêmeas atenuou o ganho de peso do grupo de animais submetidos ao treinamento, quando comparados ao grupo controle, no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Resultados a respeito do efeito do treinamento durante o período gestacional foram semelhantes aos observados durante a aplicação do protocolo de treinamento de 8 semanas, sendo que o grupo de animais que manteve o treinamento continuou a ganhar menos peso que o grupo controle apesar de não apresentar diferença significativa. Os dados de Savard e colaboradores (1986) corroboram com nosso estudo, de forma que esses pesquisadores verificaram que a natação de ratas durante a gestação não alterou o peso materno nem a ingestão alimentar dos animais. Porém, eles verificaram melhora da eficiência alimentar em virtude da prática de exercício, o que preservou tanto o metabolismo materno quanto o fetal.

Ainda relacionado ao período de prenhez, nosso estudo obteve resultado interessante, mostrando que o grupo de animais que interrompeu o treinamento na prenhez passou a ganhar peso assim como o grupo controle, sugerindo que o efeito do treinamento é perdido à medida que o treinamento é interrompido. Não existem estudos mostrando o efeito da interrupção do treinamento no período de prenhez, no entanto, já é bem reportado na literatura o efeito a curto prazo da interrupção do treinamento no aspecto metabólico referente à redução da tolerância à glicose, ação da insulina e ganho de peso (KING, DALSKY, CLUTTER *et al.*, 1988; NEUFER, SHINEBARGER e DOHM, 1992; LIU, CAO, FU *et al.*, 2009).

O último aspecto avaliado nas mães foi a dosagem da concentração de corticosterona plasmática, mensurada no 15º dia de prenhez, a fim de verificarmos se o exercício poderia ser um agente estressor ao animal, e por isso, levar a alterações no desenvolvimento da prole. No entanto, não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Sabe-se que a prenhez já é um estado em que há aumento da concentração de

corticosterona plasmática em virtude do desconforto gerado pelo excesso de peso corporal, além das alterações hormonais que ocorrem nesse período. Além disso, é bem reportado na literatura que o exercício físico crônico, protocolo adotado pelo nosso grupo, é capaz de adaptar o animal ao estresse, ou seja, um evento estressor que antes da prática regular de exercícios poderia ocasionar grande secreção desse hormônio, após o treinamento crônico pode atenuar essa resposta.

Após a manipulação das mães e a observação de alguns parâmetros que poderiam interferir no desenvolvimento da prole, realizamos a avaliação do perfil biométrico e bioquímico dos filhotes para verificarmos possíveis alterações decorrentes da manipulação materna. Nesse sentido, quando mensurada a massa corporal dos animais no 3º dia de vida pós-natal, observamos que a interrupção do treinamento durante a prenhez levou ao nascimento da prole com menor peso em relação ao grupo controle. Esse é o primeiro estudo que avaliou a interrupção do treinamento na prenhez, o que dificulta a comparação de nossos resultados. No entanto, sabe-se que o crescimento fetal é dependente do estado nutricional materno e da capacidade da placenta em transferir adequadamente os nutrientes da mãe para o feto (HOLEMANS, AERTS e VAN ASSCHE, 2003). Assim, é importante que se estabeleçam mecanismos homeostáticos no sistema mãe-placenta-feto, de maneira a garantir um equilíbrio na interação entre os diferentes fatores que regulam e influenciam a diferenciação, o crescimento e o suprimento nutricional, para um desenvolvimento saudável do feto. Alterações nestes mecanismos, como a obesidade e DM2 maternos, estão associadas com o aparecimento de anormalidades no crescimento fetal (BARKER e CLARK, 1997; VAN ASSCHE, HOLEMANS e AERTS, 2001; BOLOKER, GERTZ e SIMMONS, 2002). Nesse sentido, a interrupção do treinamento durante a prenhez pode ter alterado o ambiente metabólico materno-fetal, levando a prejuízos no desenvolvimento fetal.

Além disso, verificamos que o grupo que treinou antes e durante a gestação não teve prejuízos no peso corporal. Esses resultados já foram reportados por outros pesquisadores, no entanto, estes resultados ainda são controversos. Enquanto alguns estudos verificaram diminuição do peso corporal em animais que treinaram na prenhez (RIEMANN e KANSTRUP

HANSEN, 2000), outros estudos com animais (BELL e PALMA, 2000) e humanos (CLAPP, KIM, BURCIU *et al.*, 2002), assim como o presente, não encontraram prejuízos na massa corporal de suas proles. Nesse sentido, Bispham e colaboradores (2003) mostraram que animais prenhes tem uma capacidade importante de se adaptar às mudanças metabólicas para garantir o bom desenvolvimento da prole, e dessa forma, o peso da prole ao nascer não é afetado. Essa controvérsia nos estudos pode ser parcialmente explicada pelos diferentes protocolos adotados (tipo, intensidade e duração do exercício) e espécies que são usadas nos estudos (PIVARNIK, 1996; BISPHAM *et al.*, 2003).

Quando verificado o peso dos animais com 3 meses de vida, observamos respostas diferentes entre os gêneros, de forma que as fêmeas do grupo IT apresentaram menor massa corporal que o grupo controle e os machos apresentaram maior massa corporal. Outros estudos mostraram que a responsividade de machos e fêmeas são diferentes, por exemplo em aspectos da ingestão alimentar (APPLEGATE, UPTON e STERN, 1982), concentração de leptina plasmática (WONG, DEPAOLI, LEE *et al.*, 2004; FLANAGAN, VAILE, PETLEY *et al.*, 2007), entre outros. É interessante observar que as fêmeas, assim como ao nascimento, mantiveram o prejuízo em sua massa corporal aos 3 meses de vida, o que pode indicar uma alteração permanente no ganho de massa corporal desses animais. Uma das hipóteses que pode elucidar essa questão é a do desenvolvimento hipotalâmico, um dos principais reguladores do balanço energético. Estudos com ratos revelaram que existem dois períodos críticos para seu desenvolvimento, um deles no meio da prenhez (12º ao 17º dia de prenhez) e o segundo no início da vida (6º ao 12º dia de vida pós natal) (SINGER, KUPER, BROGAN *et al.*, 2000; MARKAKIS, 2002; GROVE, ALLEN, GRAYSON *et al.*, 2003; BOURET, DRAPER e SIMERLY, 2004). Dessa forma, sabe-se que alterações no ambiente intra-uterino podem afetar a neurogênese hipotalâmica e/ou o crescimento axonal e, assim, podem ao longo do tempo levar a conseqüências na nutrição, metabolismo (MEDEIROS, SILVA, SOUGEY *et al.*, 2001), podendo gerar uma alteração permanente nesses aspectos, como no parâmetro estudado.

Quando verificado o peso dos machos na vida adulta (apesar de não observada diferença de peso ao nascimento), nosso estudo mostrou um

aumento na massa corporal desses animais em relação ao grupo controle como já mencionado. Outros autores mostraram que animais com o mesmo peso ao nascer podem apresentar diferenças substanciais no sistema endócrino desde o nascimento até a vida adulta (WHORWOOD, FIRTH, BUDGE *et al.*, 2001; SHARKEY, GARDNER, FAINBERG *et al.*, 2009). Alguns estudos mostram que podem ocorrer adaptações em nível celular sem que haja qualquer diferença bruta da composição corporal dos animais (CHAN, SEBERT, HYATT *et al.*, 2009; SHARKEY *et al.*, 2009). Além disso, como o desenvolvimento hipotalâmico se completa após os primeiros dias de vida (BOURET *et al.*, 2004) e, neste período, o grupo de animais treinados durante a prenhez teve o treinamento suspenso devido à lactação, o desenvolvimento neural de controle do balanço energético desses animais pode ter sido afetado.

A gordura corporal quando avaliada, mostrou que o grupo T de camundongos fêmeas apresentou diferenças em relação ao grupo IT com aumento do peso da gordura perigonadal, e, nos machos, observamos uma tendência no aumento da gordura periepididimal, no entanto, não houve diferença significativa. Não existem estudos mostrando o efeito do exercício e da interrupção do mesmo na variável gordura. Sabe-se, porém, que a etapa fetal e os primeiros momentos da vida são períodos críticos, pois neste momento se estabelecem as bases moleculares, genéticas e metabólicas que condicionam o posterior desenvolvimento ou não de certas doenças. Isso porque estudos têm mostrado que parece pouco provável que os pré-adipócitos possam se proliferar e diferenciar durante a vida adulta e se isso ocorre é em pequenas proporções (MUHLHAUSLER e SMITH, 2009). Nesse sentido, a maioria dos trabalhos, se não todos, têm mostrado que o desenvolvimento no tecido adiposo é concluída no início da vida (AILHAUD, GRIMALDI e NEGREL, 1992; MARTIN, HAUSMAN e HAUSMAN, 1998), apoiando a idéia de que o período fetal e início da vida são janelas cruciais no desenvolvimento do depósito de tecido adiposo.

Um estudo de Symonds e colaboradores (2003) demonstrou que a manipulação (tanto do ambiente metabólico quanto hormonal) como consequência de um aumento ou diminuição da ingestão alimentar no final da gestação pode atuar determinando a redução ou o depósito de tecido adiposo no feto. Dessa forma, o aumento de tecido adiposo encontrado em nosso



estudo, provavelmente teve uma base no período fetal ou no início da vida, o que poderia, dessa forma, ter contribuído para o aumento no ganho de peso dos animais, tendo em vista que um grupo de pesquisadores mostrou que o aumento do tecido adiposo leva a uma dificuldade na manutenção do peso corporal, favorecendo o ganho de peso (BJORNTORP, 1991), como observado em nosso estudo.

Um parâmetro metabólico muito estudado como um dos principais reguladores do balanço energético é a leptina. Nosso estudo mostrou um aumento na concentração plasmática de leptina nos animais adultos fêmeas cujas mães mantiveram o treinamento na prenhez, no entanto, não observamos diferenças nos adultos machos, mostrando, mais uma vez respostas diferentes entre gêneros. O que foi interessante observar nesse aspecto é que nas fêmeas tanto a massa absoluta de tecido adiposo quanto à relativa aumentaram, e, ao mesmo tempo, houve aumento da secreção desse hormônio, o que se justifica já que sua concentração plasmática é dependente do tamanho do tecido adiposo. Estudos têm mostrado que o excessivo acúmulo de tecido adiposo pode estar associado à hiperleptinemia, finalmente levando à resistência central à leptina e tornando os indivíduos mais suscetíveis a um maior ganho de peso (WAJCHENBERG, 2000; SMITH, LOVEJOY, GREENWAY *et al.*, 2001), que também pode ser observado em nosso estudo. Por outro lado, nos animais machos, observamos aumento do tecido adiposo absoluto e redução da massa relativa, assim como redução na concentração plasmática de leptina. Com isso, nossos resultados sugerem que a concentração plasmática de leptina está mais relacionada à adiposidade relativa do animal, não a massa bruta de gordura.

Por último, nosso estudo verificou a concentração plasmática de insulina como possível marcador de alteração no metabolismo dos animais. A avaliação tanto da concentração plasmática de insulina nos adultos machos quanto nas fêmeas não mostrou diferença significativa entre os grupos. Apesar disso, nos animais fêmeas, observamos uma tendência ao aumento da secreção desse hormônio no grupo T de mães que mantiveram o treinamento na prenhez. Já foi demonstrado em outros estudo que o aumento da massa dos adipócitos, como encontrado por nosso grupo, leva ao aumento da secreção de insulina podendo ocasionar resistência à insulina e conseqüentemente diabetes tipo 2

(WAJCHENBERG, 2000; WEYER, FOLEY, BOGARDUS *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2001).

Nosso estudo sugere que alterações no ambiente uterino, tanto em virtude do treinamento quanto da interrupção do mesmo, podem levar a alterações importantes no perfil metabólico dos animais na vida adulta. Assim, é importante buscar entender os mecanismos que ocorrem nos períodos críticos do desenvolvimento para encontrar estratégias, como estabelecer programas de controle desde as primeiras etapas da vida que possam prevenir doenças na vida adulta.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O protocolo de treinamento de 8 semanas atenuou o ganho de peso dos animais que se exercitaram, no entanto não foram observadas diferenças significantes.

O grupo de animais que permaneceu treinando durante o período de prenhez apresentou menor peso corporal durante os 21 dias de prenhez, e, em contrapartida, os animais que interromperam o treinamento rapidamente passaram a ganhar peso como o grupo controle, no entanto, não foram observados diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

O treinamento na prenhez e a interrupção do treinamento não alteraram a concentração plasmática de corticosterona materna no 15º dia de prenhez.

A interrupção do treinamento no período de prenhez levou à diminuição do peso de sua respectiva prole ao nascer.

A prole adulta mostrou respostas diferentes entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas foram mais suscetíveis a alterações nos parâmetros estudados.

O grupo de animais fêmeas cujas mães treinaram durante o período de prenhez tiveram alterações na massa de tecido adiposo, concentração de leptina plasmática, com aumento nesses dois aspectos.

O grupo de animais machos cujas mães mantiveram o treinamento na prenhez teve apenas aumento na massa corporal, no entanto o perfil hormonal não foi afetado.

Tanto a interrupção do treinamento quanto o treinamento na prenhez podem alterar o desenvolvimento do feto e, em longo prazo, levar a repercussões importantes no metabolismo dos animais.

## ***8. REFERÊNCIAS***

ACOG. Exercise during pregnancy and the postpartum period. Washington, D.C.: American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. 267: 1-3 p. 2002.

AILHAUD, G., GRIMALDI, P. e NEGREL, R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. Annu Rev Nutr, City, v.12, p.207-33. 1992.

APPLEGATE, E. A., UPTON, D. E. e STERN, J. S. Food intake, body composition and blood lipids following treadmill exercise in male and female rats. Physiol Behav, City, v.28, n.5, May, p.917-20. 1982.

ARCIERO, P. J., SMITH, D. L. e CALLES-ESCANDON, J. Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. J Appl Physiol, v.84, n.4, Apr, p.1365-73. 1998.

BADO, A., LEVASSEUR, S., ATTOUB, S., *et al.* The stomach is a source of leptin. Nature, v.394, n.6695, Aug 20, p.790-3. 1998.

BARKER, D. J. e CLARK, P. M. Fetal undernutrition and disease in later life. Rev Reprod, v.2, n.2, May, p.105-12. 1997.

BELL, R. e PALMA, S. Antenatal exercise and birthweight. Aust N Z J Obstet Gynaecol, v.40, n.1, Feb, p.70-3. 2000.

BISPHAM, J., GOPALAKRISHNAN, G. S., DANDREA, J., *et al.* Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development. Endocrinology, v.144, n.8, Aug, p.3575-85. 2003.

BJORNTORP, P. Adipose tissue distribution and function. Int J Obes, v.15 Suppl 2, Sep, p.67-81. 1991.

BOLOKER, J., GERTZ, S. J. e SIMMONS, R. A. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. Diabetes, v.51, n.5, May, p.1499-506. 2002.

BOOTH, F. W., CHAKRAVARTHY, M. V., GORDON, S. E., *et al.* Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. J Appl Physiol, v.93, n.1, Jul, p.3-30. 2002.

BOURET, S. G., DRAPER, S. J. e SIMERLY, R. B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. J Neurosci, v.24, n.11, Mar 17, p.2797-805. 2004.

BUDGE, H., STEPHENSON, T. e SYMONDS, M. E. Maternal nutrient restriction is not equivalent to maternal biological stress. Curr Drug Targets, v.8, n.8, Aug, p.888-93. 2007.

BURT, R. L. Peripheral utilization of glucose in pregnancy. III. Insulin tolerance. Obstet Gynecol, v.7, n.6, Jun, p.658-64. 1956.

CAMPFIELD, L. A., SMITH, F. J., GUISEZ, Y., *et al.* Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science, v.269, n.5223, Jul 28, p.546-9. 1995.

CATALANO, P. M. e EHRENBERG, H. M. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. Bjog, v.113, n.10, Oct, p.1126-33. 2006.

CHAN, L. L., SEBERT, S. P., HYATT, M. A., *et al.* Effect of maternal nutrient restriction from early to midgestation on cardiac function and metabolism after adolescent-onset obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.296, n.5, May, p.R1455-63. 2009.

CIARALDI, T. P., KETTEL, M., EL-ROEIY, A., *et al.* Mechanisms of cellular insulin resistance in human pregnancy. Am J Obstet Gynecol, v.170, n.2, Feb, p.635-41. 1994.

CINTI, S., FREDERICH, R. C., ZINGARETTI, M. C., *et al.* Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. Endocrinology, v.138, n.2, Feb, p.797-804. 1997.

CLAPP, J. F., 3RD, KIM, H., BURCIU, B., *et al.* Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. Am J Obstet Gynecol, v.186, n.1, Jan, p.142-7. 2002.

CONSIDINE, R. V., SINHA, M. K., HEIMAN, M. L., *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med, v.334, n.5, Feb 1, p.292-5. 1996.

CRAIG, B. W., THOMPSON, K. e HOLLOSZY, J. O. Effects of stopping training on size and response to insulin of fat cells in female rats. J Appl Physiol, v.54, n.2, Feb, p.571-5. 1983.

DE SILVA, A., DE COURTEN, M., ZIMMET, P., *et al.* Lifestyle factors fail to explain the variation in plasma leptin concentrations in women. Nutrition, v.14, n.9, Sep, p.653-7. 1998.

DOHM, G. L., BARAKAT, H. A., TAPSCOTT, E. B., *et al.* Changes in body fat and lipogenic enzyme activities in rats after termination of exercise training. Proc Soc Exp Biol Med, v.155, n.2, Jun, p.157-9. 1977.

FELL, D. B., JOSEPH, K. S., ARMSON, B. A., *et al.* The impact of pregnancy on physical activity level. Matern Child Health J, v.13, n.5, Sep, p.597-603. 2009.

FLANAGAN, D. E., VAILE, J. C., PETLEY, G. W., *et al.* Gender differences in the relationship between leptin, insulin resistance and the autonomic nervous

system. Regul Pept, v.140, n.1-2, Apr 5, p.37-42. 2007.

GLUCKMAN, P. D. e HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. Science, v.305, n.5691, Sep 17, p.1733-6. 2004.

GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A. e PINAL, C. The developmental origins of adult disease. Matern Child Nutr, v.1, n.3, Jul, p.130-41. 2005.

GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A., SPENCER, H. G., *et al.* Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. Proc Biol Sci, v.272, n.1564, Apr 7, p.671-7. 2005.

GROVE, K. L., ALLEN, S., GRAYSON, B. E., *et al.* Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system. Neuroscience, v.116, n.2, p.393-406. 2003.

HAAS, J. S., JACKSON, R. A., FUENTES-AFFLICK, E., *et al.* Changes in the health status of women during and after pregnancy. J Gen Intern Med, v.20, n.1, Jan, p.45-51. 2005.

HAUGUEL, S., GILBERT, M. e GIRARD, J. Pregnancy-induced insulin resistance in liver and skeletal muscles of the conscious rabbit. Am J Physiol, v.252, n.2 Pt 1, Feb, p.E165-9. 1987.

HILL, J. O., WYATT, H. R., REED, G. W., *et al.* Obesity and the environment: where do we go from here? Science, v.299, n.5608, Feb 7, p.853-5. 2003.

HOLEMANS, K., AERTS, L. e VAN ASSCHE, F. A. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. J Soc Gynecol Investig, v.10, n.7, Oct, p.392-9. 2003.

HOLLINGSWORTH, D. R. Alterations of maternal metabolism in normal and diabetic pregnancies: differences in insulin-dependent, non-insulin-dependent, and gestational diabetes. Am J Obstet Gynecol, v.146, n.4, Jun 15, p.417-29. 1983.

HOUMARD, J. A., TYNDALL, G. L., MIDYETTE, J. B., *et al.* Effect of reduced training and training cessation on insulin action and muscle GLUT-4. J Appl Physiol, v.81, n.3, Sep, p.1162-8. 1996.

HU, F. B. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. Lipids, v.38, n.2, Feb, p.103-8. 2003.

INGELFINGER, J. R. Pathogenesis of perinatal programming. Curr Opin Nephrol Hypertens, v.13, n.4, Jul, p.459-64. 2004.

JOVANOVIC-PETERSON, L. e PETERSON, C. M. Is exercise safe or useful for gestational diabetic women? Diabetes, v.40 Suppl 2, Dec, p.179-81. 1991.



KAPOOR, A., DUNN, E., KOSTAKI, A., *et al.* Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. J Physiol, v.572, n.Pt 1, Apr 1, p.31-44. 2006.

KAWANAKA, K., TABATA, I., KATSUTA, S., *et al.* Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT-4 protein in rat skeletal muscle after training. J Appl Physiol, v.83, n.6, Dec, p.2043-7. 1997.

KELLER, J. B., BEVIER, W. C., JOVANOVIC-PETERSON, L., *et al.* Voluntary exercise improves glycemia in non-obese diabetic (NOD) mice. Diabetes Res Clin Pract, v.22, n.1, Oct-Nov, p.29-35. 1993.

KING, D. S., DALSKY, G. P., CLUTTER, W. E., *et al.* Effects of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness. J Appl Physiol, v.64, n.5, May, p.1942-6. 1988.

KREGEL, K. C., ALLEN, D. L., BOOTH, F. W., *et al.* Resource book for the design of animal exercise protocols. American Physiological Society. Bethesda: American Physiological Society. 2006

LAMBERT, E. V., WOODING, G., LAMBERT, M. I., *et al.* Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. J Appl Physiol, v.77, n.6, Dec, p.2564-71. 1994.

LANDT, M., LAWSON, G. M., HELGESON, J. M., *et al.* Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations. Metabolism, v.46, n.10, Oct, p.1109-12. 1997.

LETURQUE, A., FERRE, P., BURNOL, A. F., *et al.* Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. Diabetes, v.35, n.2, Feb, p.172-7. 1986.

LIU, Y., CAO, Z. D., FU, S. J., *et al.* The effect of exhaustive chasing training and detraining on swimming performance in juvenile darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*). J Comp Physiol B, v.179, n.7, Oct, p.847-55. 2009.

LUCAS, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. Arch Dis Child, v.71, n.4, Oct, p.288-90. 1994.

MAEDA, K., OKHURA, S. e TSUKAMURA, H. Physiology of reproduction: estrous cycle, identification of the estrous cycle. In: Krindle, G. J., Bullock, G. e Bunton, T. E. (Ed.). The handbook of experimental animals: the laboratory rat. San Diego: Academic Press, 2000. Physiology of reproduction: estrous cycle, identification of the estrous cycle, p.152-5

MAFFEI, M., HALAAS, J., RAVUSSIN, E., *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med, v.1, n.11, Nov, p.1155-61. 1995.

MARKAKIS, E. A. Development of the neuroendocrine hypothalamus. Front

Neuroendocrinol, v.23, n.3, Jul, p.257-91. 2002.

MARTIN, A., ZORZANO, A., CARUNCHO, I., *et al.* Glucose tolerance tests and "in vivo" response to intravenous insulin in the unanaesthetized late pregnant rat and their consequences to the fetus. Diabete Metab, v.12, n.6, Dec, p.302-7. 1986.

MARTIN, R. J., HAUSMAN, G. J. e HAUSMAN, D. B. Regulation of adipose cell development in utero. Proc Soc Exp Biol Med, v.219, n.3, Dec, p.200-10. 1998.

MASUZAKI, H., OGAWA, Y., SAGAWA, N., *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nat Med, v.3, n.9, Sep, p.1029-33. 1997.

MEDEIROS, J. M., SILVA, C. M., SOUGEY, E. B., *et al.* Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. Arq Neuropsiquiatr, v.59, n.3-A, Sep, p.499-503. 2001.

MERCER, J. G., HOGGARD, N., WILLIAMS, L. M., *et al.* Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol, v.8, n.10, Oct, p.733-5. 1996.

MOORE, M. S. Interactions between physical activity and diet in the regulation of body weight. Proc Nutr Soc, v.59, n.2, May, p.193-8. 2000.

MOTTOLA, M. F., MEZZAPELLI, J., SCHACHTER, C. L., *et al.* Training effects on maternal and fetal glucose uptake following acute exercise in the rat. Med Sci Sports Exerc, v.25, n.7, Jul, p.841-6. 1993.

MUHLHAUSLER, B. e SMITH, S. R. Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. Trends Endocrinol Metab, v.20, n.2, Mar, p.51-7. 2009.

MUNOZ, C., LOPEZ-LUNA, P. e HERRERA, E. Treadmill training enhances glucose tolerance more in pregnant than in virgin rats. Biol Neonate, v.75, n.5, May, p.337-42. 1999.

MURGATROYD, P. R., GOLDBERG, G. R., LEAHY, F. E., *et al.* Effects of inactivity and diet composition on human energy balance. Int J Obes Relat Metab Disord, v.23, n.12, Dec, p.1269-75. 1999.

NAEYE, R. L. e PETERS, E. C. Working during pregnancy: effects on the fetus. Pediatrics, v.69, n.6, Jun, p.724-7. 1982.

NEUFER, P. D., SHINEBARGER, M. H. e DOHM, G. L. Effect of training and detraining on skeletal muscle glucose transporter (GLUT4) content in rats. Can J Physiol Pharmacol, v.70, n.9, Sep, p.1286-90. 1992.

OLIVEIRA, A. O., FILETO, C. e MELIS, M. S. Effect of strenuous maternal exercise before and during pregnancy on rat progeny renal function. Braz J Med Biol Res, v.37, n.6, Jun, p.907-11. 2004.

PARENTE, L. B., AGUILA, M. B. e MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. Clin Nutr, v.27, n.4, Aug, p.623-34. 2008.

PETIBOIS, C., CASSAIGNE, A., GIN, H., *et al.* Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.7, Jul, p.3377-84. 2004.

PINTO, M. L. e SHETTY, P. S. Influence of exercise-induced maternal stress on fetal outcome in Wistar rats: inter-generational effects. Br J Nutr, v.73, n.5, May, p.645-53. 1995.

PIVARNIK, J. M. Cardiovascular responses to aerobic exercise during pregnancy and postpartum. Semin Perinatol, v.20, n.4, Aug, p.242-9. 1996.

RADAK, Z., CHUNG, H. Y. e GOTO, S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. Biogerontology, v.6, n.1, p.71-5. 2005.

RADAK, Z., CHUNG, H. Y., NAITO, H., *et al.* Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. Faseb J, v.18, n.6, Apr, p.749-50. 2004.

RADAK, Z., GOTO, S., NAKAMOTO, H., *et al.* Lung cancer in smoking patients inversely alters the activity of hOGG1 and hNTH1. Cancer Lett, v.219, n.2, Mar 10, p.191-5. 2005.

RAMOS, P. e HERRERA, E. Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. Am J Physiol, v.269, n.5 Pt 1, Nov, p.E858-63. 1995.

RIEMANN, M. K. e KANSTRUP HANSEN, I. L. Effects on the foetus of exercise in pregnancy. Scand J Med Sci Sports, v.10, n.1, Feb, p.12-9. 2000.

RYAN, E. A., O'SULLIVAN, M. J. e SKYLER, J. S. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. Diabetes, v.34, n.4, Apr, p.380-9. 1985.

SAVARD, R., PALMER, J. E. e GREENWOOD, M. R. Effects of exercise training on regional adipose tissue metabolism in pregnant rats. Am J Physiol, v.250, n.5 Pt 2, May, p.R837-44. 1986.

SCHULZ, L. O. e SCHOELLER, D. A. A compilation of total daily energy expenditures and body weights in healthy adults. Am J Clin Nutr, v.60, n.5, Nov, p.676-81. 1994.

SCHWARTZ, M. W., SEELEY, R. J., CAMPFIELD, L. A., *et al.* Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. J Clin Invest, v.98, n.5, Sep 1, p.1101-6. 1996.

SEWELL, M. F., HUSTON-PRESLEY, L., SUPER, D. M., *et al.* Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. Am J Obstet Gynecol, v.195, n.4, Oct, p.1100-3. 2006.

SHARKEY, D., GARDNER, D. S., FAINBERG, H. P., *et al.* Maternal nutrient restriction during pregnancy differentially alters the unfolded protein response in adipose and renal tissue of obese juvenile offspring. Faseb J, v.23, n.5, May, p.1314-24. 2009.

SHEPARD, T. Y., WEIL, K. M., SHARP, T. A., *et al.* Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. Am J Clin Nutr, v.73, n.4, Apr, p.703-8. 2001.

SINGER, L. K., KUPER, J., BROGAN, R. S., *et al.* Novel expression of hypothalamic neuropeptide Y during postnatal development in the rat. Neuroreport, v.11, n.5, Apr 7, p.1075-80. 2000.

SMITH, S. R., LOVEJOY, J. C., GREENWAY, F., *et al.* Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. Metabolism, v.50, n.4, Apr, p.425-35. 2001.

SYMONDS, M. E., MOSTYN, A., PEARCE, S., *et al.* Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. J Endocrinol, v.179, n.3, Dec, p.293-9. 2003.

TERAN-GARCIA, M., RANKINEN, T., KOZA, R. A., *et al.* Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, n.6, Jun, p.E1168-78. 2005.

TREUTH, M. S., BUTTE, N. F. e PUYAU, M. Pregnancy-related changes in physical activity, fitness, and strength. Med Sci Sports Exerc, v.37, n.5, May, p.832-7. 2005.

VAN ASSCHE, F. A., HOLEMANS, K. e AERTS, L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. Br Med Bull, v.60, p.173-82. 2001.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr Rev, v.21, n.6, Dec, p.697-738. 2000.

WEYER, C., FOLEY, J. E., BOGARDUS, C., *et al.* Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. Diabetologia, v.43, n.12, Dec, p.1498-506. 2000.

WHORWOOD, C. B., FIRTH, K. M., BUDGE, H., *et al.* Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. Endocrinology, v.142, n.7, Jul, p.2854-64. 2001.

WONG, S. L., DEPAOLI, A. M., LEE, J. H., *et al.* Leptin hormonal kinetics in the fed state: effects of adiposity, age, and gender on endogenous leptin production and clearance rates. J Clin Endocrinol Metab, v.89, n.6, Jun, p.2672-7. 2004.

YAMANOUCHI, K., SHINOZAKI, T., CHIKADA, K., *et al.* Daily walking combined with diet therapy is a useful means for obese NIDDM patients not only to reduce body weight but also to improve insulin sensitivity. Diabetes Care, v.18, n.6, Jun, p.775-8. 1995.

YASARI, S., DUFRESNE, E., PRUD'HOMME, D., *et al.* Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. Physiol Behav, v.91, n.2-3, Jun 8, p.281-9. 2007.

YASARI, S., PAQUETTE, A., CHARBONNEAU, A., *et al.* Effects of ingesting a high-fat diet upon exercise-training cessation on fat accretion in the liver and adipose tissue of rats. Appl Physiol Nutr Metab, v.31, n.4, Aug, p.367-75. 2006.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, v.372, n.6505, Dec 1, p.425-32. 1994.

---

## **9. ANEXOS**



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de setembro de 2006  
**CEP 1225/06**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) BRUNO FREDERICO AGUILAR CALEGARE

Co-Investigadores: Monica Levy Andersen, Vania D'Almeida (orientadora), Sergio Tufik

Disciplina/Departamento: Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP/AFIP.

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Alterações bioquímicas, epigenéticas e comportamentais em camundongos adultos em resposta à privação de sono de suas mães após a fertilização"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos da privação de sono nos primeiros estágios após fertilização sobre a vida adulta dos camundongos em parâmetros de estresse oxidativo, homocisteína, indicadores de metilação de DNA e as possíveis alterações comportamentais.

RESUMO: Serão utilizados 200 camundongos Balb/c. Anestésico: cloridrato de cetamina e diazepam. Analgésico: diclofenaco. Eutanásia: decapitação. Camundongas prenhes serão submetidas à privação de sono por 72 horas pelo método da plataforma, ou pelo método de manipulação gentil. Serão utilizados 3 sub-grupos, privados cada um por 6 horas, em tempos diferentes de gestação: 24, 48 e 72 horas. Após a privação de sono, será realizada uma coleta de sangue das mães, para avaliação dos níveis de homocisteína e posteriormente as mesmas continuarão suas gestações normalmente. Após o nascimento, cada grupo de animais será avaliado, medido e pesado semanalmente, até atingir a idade adulta, quando serão submetidos às avaliações comportamentais, bioquímicas e moleculares. Será dosada homocisteína no sangue. Será retirado tecido cerebral para análise da expressão de metiltransferases e níveis de glutatona oxidada, glutatona reduzida, glutatona total e atividade da catalase e superóxido dismutase. Para avaliar a metilação, será realizado um ensaio de expressão das metiltransferases 1, 3A e 3B em amostras de hipotálamo por RT-PCR. Avaliação do comportamento será realizada em campo aberto e labirinto em cruz elevado. Registro eletrocorticográfico serão obtidos para análise polissonográficas.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo visando avaliar alterações bioquímicas, epigenéticas e comportamentais em camundongos adultos em resposta à privação de sono de suas mães após a fertilização.

MATERIAL E MÉTODO: estão descritos os procedimentos, utilizando metodologia de domínio da equipe envolvida. O laboratório apresenta infra-estrutura adequada para a realização da pesquisa, constituindo linha de pesquisa da orientadora.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP e AFIP - R\$ 13.120,00.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 10/9/2007 e 4/9/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo